

10/516517

T/JP03/12967

09.10.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

02 DEC 2004

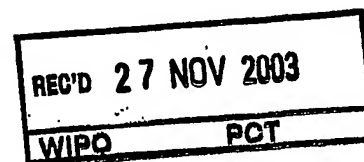
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 2 年 1 0 月 1 1 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 2 - 2 9 8 9 5 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [ J P 2 0 0 2 - 2 9 8 9 5 8 ]

出 願 人      山之内製薬株式会社  
Applicant(s):

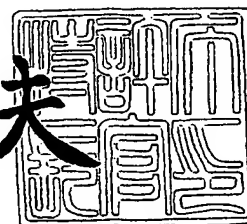


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 1 月 1 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号      出証特 2 0 0 3 - 3 0 9 3 7 3 !

【書類名】 特許願

【整理番号】 0000003199

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 遠城 健太郎

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 黒光 貞夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000006677

    【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100089200

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 長井 省三

【選任した代理人】

    【識別番号】 100109357

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005348

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腎不全治療薬をスクリーニングする方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ、CTGFプロモーターを活性化することができるポリペプチドである腎不全治療薬スクリーニングツール。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドを発現している細胞である腎不全治療薬スクリーニングツール。

【請求項3】 C末端のアミノ酸配列が、配列番号16で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性G蛋白質のホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドとGiの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるG蛋白質キメラを共発現している請求項2に記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び前記細胞内における請求項1に記載のポリペプチドの活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、試験化合物がFGKインバースアゴニストであるか否かを検出する方法。

【請求項4】 C末端のアミノ酸配列が、配列番号16で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性G蛋白質のホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドとGiの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるG蛋白質キメラを共発現している請求項2に記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程及び

前記細胞内における請求項1に記載のポリペプチドの活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、腎不全治療薬をスクリーニングする方法。

【請求項5】 下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号13のDNAを発現している請求項2に記載の細胞と試験化合物とを接触させる工程及び前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とするCTGFの発現を抑制する物質をスクリーニングする方法。

【請求項6】 CTGFの発現を抑制する物質が腎不全治療薬である請求項5に記載の

スクリーニングする方法。

【請求項 7】下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号 1 4 の DNA を発現している請求項 2 に記載の細胞と試験化合物とを接触させる工程及び前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とする腎不全治療薬をスクリーニングする方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0 0 0 1】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、オーファン GPCR を発現している細胞及び該細胞を使用する腎不全治療薬のスクリーニング法に関するものである。

#### 【0 0 0 2】

#### 【従来の技術】

わが国の腎疾患による慢性透析患者は年々増加しており、2000 年現在で 20 万人を超えている。これは医療経済的にも大きな問題であり、その進行の改善が強く望まれている。腎障害の原因は慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、高血圧性腎硬化症など多岐に渡り、成因も免疫学的機序、高血圧等様々である。しかし原因に拠らず、ある段階から糸球体障害には共通の進展機序が考えられている。それは Brenner らによって提唱された過剰濾過 (hyperfiltration) 説に基づく考え方である（例えば、非特許文献 1 参照）。以下に過剰濾過説を概説すると、まず糸球体障害による機能ネフロン減少、高血圧、高血糖、蛋白過剰摂取等により腎臓内の血行動態が変化して糸球体内圧の上昇が起こり、いわゆる糸球体内高血圧と呼ばれる状態になる。そしてこれが糸球体細胞障害を惹起する。その結果メサングウム細胞の形質変換、細胞外基質の産生亢進を促し、更には糸球体硬化へと進展する。これにより機能ネフロンが減少すると残存する機能ネフロンの糸球体内圧は更に上昇する。当初は糸球体が代償的に肥大し、機能喪失したネフロンを補うが、最終的には物理的破綻をきたす。この悪循環によって糸球体硬化が加速度的に進行し、末期腎不全に陥る。この糸球体硬化及び尿細管間質における細胞外基質の産生亢進は総じて腎線維化 (renal fibrosis) と呼ばれており、原疾患を問わず腎不

全進行と一致する組織学的変化である（例えば、非特許文献2参照）。よって個々の原疾患に対する治療の重要性は言うまでもないが、共通の進行機序である線維化の抑制は有力な治療アプローチであると考えられる。

線維化には様々なサイトカインや成長因子の関与が知られているが、中でもTGF- $\beta$ はファイブロネクチンやI型コラーゲンなどの細胞外基質構成蛋白質の産生を誘導すること（例えば、非特許文献3参照）、細胞外基質分解酵素の発現/機能を抑制すること（例えば、非特許文献4参照）等から最も重要な進展因子と考えられている。更にTGF- $\beta$ 中和抗体（例えば、非特許文献5参照）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、非特許文献6参照）、デコリン（例えば、非特許文献7参照）、TGF- $\beta$ レセプター中和抗体（例えば、非特許文献8参照）を用いたTGF- $\beta$ の発現/機能抑制が腎臓の細胞外基質の増加を抑制することが腎炎モデル動物で示されており、その有効性がすでに明らかになっている。この様にTGF- $\beta$ シグナル阻害は腎線維化抑制を機序とする腎不全治療につながることを示されている。しかしTGF- $\beta$ は線維化促進作用の他にも抗炎症作用や腫瘍増殖抑制作用を持つ重要なサイトカインであり、TGF- $\beta$ ノックアウトマウスは自己免疫疾患で死亡する（例えば、非特許文献9参照）ことなどから、線維化抑制のためにはTGF- $\beta$ を直接阻害するのではなく、TGF- $\beta$ の下流でその線維化促進作用を仲介する因子を阻害することがより望ましいと考えられる（例えば、非特許文献10参照）。

近年TGF- $\beta$ により発現が誘導される新しいサイトカインの結合組織成長因子(CTGF)が発見され（例えば、非特許文献11参照）、CTGF発現により細胞外基質の産生が誘導されること（例えば、非特許文献12参照）、CTGF アンチセンスオリゴヌクレオチドや抗CTGF抗体によりTGF- $\beta$ 誘導のコラーゲン発現が抑制されること（例えば、非特許文献13参照）、ヒト腎線維化病理組織像においてCTGFの発現が上昇していること（例えば、非特許文献14参照）などが報告されている。これらを総合すると、腎組織においてTGF- $\beta$ がCTGFの発現を誘導し、更にCTGFがTGF- $\beta$ と共に細胞外基質の産生を亢進させて線維化を促進させる機序が明らかになった（例えば、非特許文献15参照）。すなわちCTGFが腎線維化においてTGF- $\beta$ の下流に位置するサイトカインであることが明らかになり、新たな治療標的と

なることが示された（例えば、非特許文献16参照）。またTGF- $\beta$ やCTGFによって発現が誘導されるI型コラーゲンはヒト正常腎では発現が低く、病態腎の糸球体や尿細管上皮において発現が上昇していること（例えば、非特許文献17参照）、培養マウスメサンギウム細胞での高糖負荷による内在性TGF- $\beta$ 発現誘導によりI型コラーゲンの発現が上昇すること（例えば、非特許文献18参照）など、病態との関与が指摘されている。

FGK (Fibrogenic GPCR in kidney) は2001年に報告されたGPR91と同一のオーファンGPCRである（例えば、非特許文献19参照）。ヒトGPR91、マウスGPR91はそれぞれアミノ酸330個、317個から成るポリペプチドであり、膜貫通領域を7箇所持つ7回膜貫通型レセプターと考えられている。ヒト、マウスGPR91は互いに約68%の相同性を有している。ヒトGPR91は腎臓にのみ発現が認められ、マウスGPR91は腎臓のほかに肝臓にも若干の発現が見られる。アフリカツメガエル卵黄を用いた反応系において、UTPがヒトGPR91のリガンドとして機能することが報告されている（例えば、特許文献1参照）が、GPR91に共役するGタンパク質や生理機能は不明である。

#### 【0003】

##### 【特許文献1】

国際公開WO97/20045号パンフレット

##### 【特許文献2】

国際公開WO97/24929号パンフレット

##### 【特許文献3】

国際公開WO01/98351号パンフレット

##### 【特許文献4】

国際公開WO00/22131号パンフレット

##### 【特許文献5】

国際公開WO00/31258号パンフレット

##### 【特許文献6】

国際公開WO00/61628号パンフレット

##### 【非特許文献1】

「ザ・ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン (The New England Journal of Medicine)」、(米国)、1982年、第307巻、p. 652-659

【非特許文献2】

「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ソサイアティー・オブ・ネフロロジー (Journal of the American Society of Nephrology)」、(米国)、1996年、第7巻、p. 2495-2508

【非特許文献3】

「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、1987年、第262巻、p. 6443-6446

【非特許文献4】

「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ソサイアティー・オブ・ネフロロジー (Journal of the American Society of Nephrology)」、(米国)、1999年、第10巻、p. 790-795

【非特許文献5】

「ネイチャー (Nature)」、(英国)、1990年、第346巻、p. 371-374

【非特許文献6】

「キドニー・インターナショナル (Kidney international)」、(米国)、1996年、第50巻、p. 148-155

【非特許文献7】

「ネイチャー (Nature)」、(英国)、1992年、第360巻、p. 361-364

【非特許文献8】

「キドニー・インターナショナル (Kidney international)」、(米国)、2001年、第60巻、p. 1745-1755

【非特許文献9】

「ネイチャー (Nature)」、(英国)、1992年、第359巻、p. 6

93-699

【非特許文献10】

「キドニー・インターナショナル (Kidney international)」、(米国)、2000年、第58巻、p. 1389-1399

【非特許文献11】

「モレキュラー・バイオロジー・オブ・ザ・セル (Molecular Biology of the Cell)」、(米国)、1993年、第4巻、p. 637-645

【非特許文献12】

「ザ・ジャーナル・オブ・インベスティゲイティブ・ダーマトロジー (The Journal of Investigative Dermatology)」、(米国)、1996年、第107巻、p. 404-411

【非特許文献13】

「ジ・エフエーエスイービー・ジャーナル (The FASEB Journal)」、(米国)、1999年、第13巻、p. 1774-1786

【非特許文献14】

「キドニー・インターナショナル (Kidney international)」、(米国)、1998年、第53巻、p. 853-861

【非特許文献15】

「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ソサイアティー・オブ・ネフロロジー (Journal of the American Society of Nephrology)」、(米国)、2001年、第12巻、p. 472-484

【非特許文献16】

「キドニー・インターナショナル (Kidney international)」、(米国)、2000年、第58巻、p. 1389-1399

【非特許文献17】

「キドニー・インターナショナル (Kidney international)」、(米国)、2002年、第62巻、p. 137-146

【非特許文献18】



「ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲイション (The Journal of Clinical Investigation)」、(米国)、1994年、第93巻、p. 536-542

【非特許文献19】

「ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)」、(英国)、2001年、第307巻、p. 799-813

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、腎不全治療薬をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、オーファンGPCRであるFGKが腎不全における創薬標的と考えられるCTGFのプロモーターを活性化することを見出した。FGK阻害を指標にCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、すなわちFGK阻害剤を選択することによるCTGF発現抑制に基づく腎不全治療薬のスクリーニング方法及びFGK阻害剤を選択することによる腎不全治療薬をスクリーニングする方法を確立し本発明を完成させた。

【0006】

すなわち本発明は、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ、CTGFプロモーターを活性化することができるポリペプチドである腎不全治療薬スクリーニングツール、
- (2) 請求項1に記載のポリペプチドを発現している細胞である腎不全治療薬スクリーニングツール、
- (3) C末端のアミノ酸配列が、配列番号16で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性G蛋白質のホスホリパーゼC活性促進活性を

有する部分ポリペプチドとGiの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるG蛋白質キメラを共発現している請求項2に記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び

前記細胞内における請求項1記載のポリペプチドの活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、試験化合物がFGKインバースアゴニストであるか否かを検出する方法、

(4) C末端のアミノ酸配列が、配列番号16で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性G蛋白質のホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドとGiの受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるG蛋白質キメラを共発現している請求項2に記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程及び

前記細胞内における請求項1記載のポリペプチドの活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、腎不全治療薬をスクリーニングする方法、

(5) 下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号13のDNAを発現している請求項2に記載の細胞と試験化合物とを接触させる工程及び  
前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とするCTGFの発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、

(6) CTGFの発現を抑制する物質が腎不全治療薬である請求項5に記載のスクリーニングする方法、

(7) 下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号14のDNAを発現している請求項2に記載の細胞と試験化合物とを接触させる工程及び  
前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とする腎不全治療薬をスクリーニングする方法  
に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明で使用される用語につき説明する。

本明細書中で使用される「FGK」は「FGK蛋白質」を、「インバースアゴニスト」はFGKの自発活性（すなわちFGKリガンド又はアゴニスト非存在下において、あ

る平衡状態で存在する活性化FGKにより検出される活性)を抑制する物質を表す。あるポリペプチドが「CTGFプロモーターを活性化する」か否かの判定方法は、特に限定されるものではないが、例えば実施例3に記載の条件下で容量依存的な該ポリペプチドによる転写活性化を示すか否かを確認することにより、判定することができる。「Gi」は、受容体と共役して細胞内へのシグナル伝達・増幅因子として機能するG蛋白のサブファミリーの1つであって、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制するG蛋白質である。アデニル酸シクラーゼの活性が抑制されると、例えば、細胞内cAMP濃度が低下する。「ホスホリパーゼC活性促進性G蛋白質」は、受容体と共役して細胞内へのシグナル伝達・増幅因子として機能するG蛋白質のサブファミリーの1つであって、ホスホリパーゼCの活性を促進するG蛋白質である。ホスホリパーゼCの活性化が促進されると、例えば、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する。ホスホリパーゼC活性促進性G蛋白質としては、例えば、Gqを挙げることができる。

#### 【0008】

##### <腎不全治療薬スクリーニングツール>

本発明の腎不全治療薬スクリーニングツールには、ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールと、細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールとが含まれる。

##### (1) ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツール

本発明のポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールには、

- 1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである腎不全治療薬スクリーニングツール；
- 2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ、CTGFプロモーターを活性化することができるポリペプチド（以下、機能的等価改変体と称する）である腎不全治療薬スクリーニングツール；

- (3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、かつ、CTGFプロモーターを活性化することができるポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）である腎不全治療薬スクリーニングツール

が含まれる。

ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールのうち、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、公知のヒト由来のオーファンGPCRの一つであり、当該ポリペプチドをヒトFGKと称する。

ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることのできる機能的等価改変体としては、、「配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ、CTGFプロモーターを活性化することができるポリペプチド」が好ましい。

相同ポリペプチドのうち好ましいものは、配列番号2で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、更に好ましくはCTGFプロモーターを活性化することができる蛋白質である。なお、本明細書における前記「相同性」とは、Clustal program (HigginsとSharp、Gene、第73巻、第237-244頁、1998年；Thompsonら、Nucleic Acid Res.、第22巻、第4673-4680頁、1994年) 検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値を意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Pairwise Aliment Parametersとして

K tuple 1

Gap Penalty 3

Window 5

Diagonals Saved 5

【0009】

本発明のポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることのできる各種ポリペプチド、すなわち、ヒトFGK、機能的等価改変体、及び相同蛋白質を、以下、スクリーニングツール用ポリペプチドと称する。

スクリーニングツール用ポリペプチドには、ヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由

来のFGK又はその変異体が含まれる。更には、それらの天然蛋白質（すなわち、ヒト由来の変異体、又はヒト以外の生物由来のFGK若しくはその変異体）又はヒトFGKを元にして遺伝子工学的に人為的に改変した蛋白質などが含まれる。なお、本明細書において「変異体」（variation）とは、同一種内の同一蛋白質にみられる個体差、あるいは、数種間の相同蛋白質にみられる差異を意味する。

ヒトFGKのヒトにおける変異体、又はヒト以外の生物由来のFGK若しくはその変異体は、当業者であれば、ヒトFGK遺伝子の塩基配列（例えば、配列番号1で表される塩基配列）の情報を基にして、取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法（Maniatis, T.ら, 「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982等）に従って実施することが可能である。

例えば、ヒトFGK遺伝子の塩基配列の情報を基にして適当なプライマー又はプローブを設計し、前記プライマー又はプローブと、目的とする生物〔例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）〕由来の試料（例えば、総RNA若しくはmRNA画分、cDNAライブラリー、又はファージライブラリー）とを用いてPCR法又はハイブリダイゼーション法を実施することにより、蛋白質の遺伝子を取得し、その遺伝子を適当な発現系を用いて発現させ、発現した蛋白質が、例えば、実施例3に記載の方法により、CTGFプロモーターを活性化することを確認することにより、所望の蛋白質を取得することができる。

また、前記の遺伝子工学的に人為的に改変した蛋白質は、常法、例えば、部位特異的突然変異誘発法（site-specific mutagenesis; Mark, D.F.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984）により、蛋白質の遺伝子を取得し、その遺伝子を適当な発現系を用いて発現させ、発現した蛋白質が、例えば、実施例3に記載の方法により、CTGFプロモーターを活性化することを確認することにより、所望の蛋白質を取得することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドは、種々の公知の方法によって得ることができ、例えば、目的蛋白質をコードする遺伝子を用いて公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。より具体的には、後述する細胞又は形質転換細胞（すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするDNAを含む発

現ベクターで形質転換され、前記ポリペプチドを発現している形質転換細胞)を、スクリーニングツール用ポリペプチドの発現が可能な条件下で培養し、受容体蛋白質の分離及び精製に一般的に用いられる方法により、その培養物から目的蛋白質を分離及び精製することにより調製することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドを調製する際に、それをコードする遺伝子を取得する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、ヒトFGKを調製する場合には、それをコードする遺伝子として、例えば、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAを用いることができる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば、利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従って決定することができる (Crantham, R. ら, *Nucleic Acids Res.*, 9, r43-r74, 1981)。

配列番号1で表される塩基配列からなるDNAは、例えば、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することにより取得することもできるし、あるいは、ヒトFGKの産生能力を有する細胞又は組織に由来するcDNAライブラリーを鋳型とし、配列番号1で表される塩基配列に基づいて設計した適当なプライマーセットを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法 (Saiki, R. K. ら, *Science*, 239, 487-491, 1988) により、取得することもできる。前記のヒトFGKの産生能力を有する細胞又は組織としては、例えば、ヒト腎臓などを挙げることもできる。また、前記プライマーセットとしては、配列番号3で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号4で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせを挙げることもできる。

スクリーニングツール用ポリペプチドの調製において使用することのできる分離及び精製方法は、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順で実施することができる。例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドを表面に発現することができる。例えば、スクリーニングツール用ポリペプチドを表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁した後、ホモジナイズし、遠心分離することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを含む細胞膜画分を得ることができる。得られた細胞膜画分を可溶化した後、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、各種液体クロマトグラフィー [例えば、分子ふるいクロマトグラフィー (ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラ

フィー、アフィニティークロマトグラフィー、又は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等]、若しくは透析法、又はこれらの組合せ等により、スクリーニングツール用ポリペプチドを精製することができる。なお、細胞膜画分を可溶化するには、できるだけ緩やかな可溶化剤（例えば、CHAPS、Triton X-100、又はジキトニン等）を用いることにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

スクリーニングツール用ポリペプチドを調製するには、所望に応じて、スクリーニングツール用ポリペプチドと適当なマーカー配列とをインフレームで融合して発現させることで、前記ポリペプチドの発現の確認、細胞内局在の確認、又は精製等を容易に行なうことができる。前記マーカー配列としては、例えば、FLAGエピトープ、ヘキサースチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げるができる。また、マーカー配列とスクリーニングツール用ポリペプチドとの間に、プロテアーゼ（例えば、エンテロキナーゼ、ファクターXa、又はトロンビンなど）が認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去することが可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体とヘキサースチジン・タグとをトロンビン認識配列で連結した報告がある（Hayashi, M. K. 及びHaga, T., J. Biochem., 120, 1232-1238, 1996）。

#### 【0010】

##### (2) 細胞型腎不全治療薬スクリーニングツール

本発明の細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールには、

- 1) ヒトFGKを発現している細胞である、腎不全治療薬スクリーニングツール；
- 2) 機能的等価改変体を発現している細胞である、腎不全治療薬スクリーニングツール；及び
- 3) 相同蛋白質を発現している細胞である、腎不全治療薬スクリーニングツールが含まれる。

本発明の細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることのできる細胞（以下、スクリーニングツール用細胞と称する）は、細胞型腎不全治療薬スク

リーニングツールとして用いる際に前記スクリーニングツール用ポリペプチドを発現している限り、特に限定されるものではなく、人為的に前記ポリペプチドを発現させた形質転換細胞であることもできるし、または、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することが知られている天然の細胞又はその細胞株であることもできるが、人為的に前記ポリペプチドを発現させた形質転換細胞が好ましい。

本発明の細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることのできる各種形質転換細胞（以下、スクリーニングツール用形質転換細胞と称する）を作成するために使用することのできる宿主細胞は、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することができる限り、特に限定されるものではなく、例えば、通常使用される公知の微生物、例えば、大腸菌又は酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、あるいは、公知の培養細胞、例えば、脊椎動物細胞（例えば、CHO細胞、HEK293細胞、又はCOS細胞）又は昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）を挙げることができる。

前記脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（Gluzman, Y., Cell, 23, 175-182, 1981）、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO）のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株（Urlaub, G. 及び Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980）、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、あるいは、前記HEK293細胞にエプスタイン・バーウイルスのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞（インビトロジェン社）を挙げることができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞を作成するために使用することのできる発現ベクターは、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することができる限り、特に限定されるものではなく、使用する宿主細胞の種類に応じて、適宜選択することができる。

例えば、脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用することができ、更に必要により、複製起点を有していることができる。前記発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr（Subramani, S. ら, Mol. Cell. Biol., 1, 8



54-864, 1981)、ヒトの延長因子プロモーターを有するpEF-BOS(Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又はサイトメガロウイルスプロモーターを有するpCEP4 (インビトロジェン社) 等を挙げることができる。

より詳細には、宿主細胞としてCOS細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、更に、転写プロモーター、転写終結シグナル、及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. 及びTakebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS(Mizushima, S. 及びNagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又はpCDM8(Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987)等を挙げることができる。

前記発現ベクターは、例えば、DEAE-デキストラン法(Luthman, H. 及びMagnusson, G., Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F.L. 及びvan der Ed, A.J., Virology, 52, 456-457, 1973)、カチオン性リポソーム試薬(Lipofectamine; Gibco BRL社)を用いた方法、あるいは、電気パルス穿孔法(Neumann, E. ら, EMBO J., 1, 841-845, 1982)等により、COS細胞に取り込ませることができる。

また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現することのできるベクター、例えば、pRSVneo(Sambrook, J. ら, 「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)又はpSV2-neo(Southern, P.J. 及びBerg, P., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341, 1982)等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、スクリーニングツール用ポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

更に、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、発現ベクターとして、エプスタイン・バーウイルスの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4 (インビトロジェン社) などを用いることができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞は、常法に従って培養することができ、前記培養により細胞内又は細胞表面にスクリーニングツール用ポリペプチドが生

産される。前記培養に用いることのできる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種の培地を適宜選択することができる。例えば、COS細胞の場合には、例えば、RPMI-1640培地又はダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に、必要に応じて牛胎仔血清 (FBS) 等の血清成分を添加した培地を使用することができる。また、293-EBNA細胞の場合には、牛胎仔血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418を加えた培地を使用することができる。

スクリーニングツール用形質転換細胞は、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現している限り、特に限定されるものではない。スクリーニングツール用形質転換細胞は、スクリーニングツール用ポリペプチドに加え、C末端のアミノ酸配列が、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列 (Asp-Cys-Gly-Leu-Phe) である G 蛋白質を発現していることが好ましい。配列番号 16 で表されるアミノ酸配列は、Gi の C 末端の 5 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列であり、以下、「C 末端のアミノ酸配列が配列番号 16 で表されるアミノ酸配列である G 蛋白質」を「C 末端 Gi 型 G 蛋白質」と称する。

前記 C 末端 Gi 型 G 蛋白質としては、例えば、(1) Gi、又は (2) C 末端のアミノ酸配列が、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼ C 活性促進性 G 蛋白質 (例えば、Gq) のホスホリパーゼ C 活性促進活性を有する部分ポリペプチドと Gi の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラである G 蛋白質キメラを挙げることができる。以下、Gq のホスホリパーゼ C 活性促進活性を有する部分ポリペプチドと Gi の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラである G 蛋白質キメラを、Gqi と称する。

スクリーニングツール用ポリペプチドは、Gi の C 末端の 5 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列 (すなわち、配列番号 16 で表されるアミノ酸配列) を認識して、Gi と結合する。従って、スクリーニングツール用ポリペプチドは、Gi のみならず、Gqi と結合することができる。スクリーニングツール用形質転換細胞において、スクリーニングツール用ポリペプチドと C 末端 Gi 型 G 蛋白質とが発現されると、これらのポリペプチドは細胞内で結合することができる。

前記 Gqi における「Gq のホスホリパーゼ C 活性促進活性を有する部分ポリペプチ

ド」は、C末端アミノ酸配列を含まず、しかも、ホスホリパーゼCの活性を促進する活性を有する限り、特に限定されるものではないが、例えば、C末端の5アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を欠失したGqのN末端側部分ポリペプチドを挙げることができる。

前記Gqiにおける「Giの受容体共役活性を有する部分ポリペプチド」は、GiのC末端の5アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含み、しかも、アデニル酸シクラーゼの活性を抑制する活性を有しない限り、特に限定されるものではないが、例えば、配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるGiのC末端側部分ポリペプチドを挙げることができる。

### 【0011】

#### <FGKのインバースアゴニスト検出方法>

前記スクリーニングツール用ポリペプチド、又はスクリーニングツール用細胞を検出ツールに用いて、試験化合物がFGKのインバースアゴニストであるか否かを検出することができる。腎不全治療薬の標的となるCTGFのプロモーターを活性化するFGKは、それ自身単独でも腎不全治療薬スクリーニングツールとして用いることができ、FGKのインバースアゴニストは腎不全治療薬として有用な物質である。本発明の検出方法において、FGK活性の変化は、スクリーニングに用いる該蛋白質の生理学的な特性に応じた活性の指標を測定することにより行われる。指標とは、たとえば $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変動やcAMP量の変動である。具体的には、以下に述べるような検出方法を示すことができる。FGKとしては、該受容体を発現させた細胞、該細胞の膜分画、又は該蛋白質精製標品などを用いることもできる。

本発明による、試験化合物がFGKのインバースアゴニストであるか否かを検出する方法には、

- 1) 細胞内における $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変動を指標として、FGKに対するインバースアゴニストであるか否かを検出する方法（すなわち、 $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法）；
- 2) 細胞内におけるcAMP量の変動を指標として、FGKに対するインバースアゴニストであるか否かを検出する方法（すなわち、cAMP型検出方法）；及び
- 3)  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合法を利用するFGKに対するインバースアゴニストであるか否かを検出する方法（以下、 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合型検出方法と称する）

が含まれる。これらの検出方法について、順次説明する。

## 【0012】

### 1) $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法

本発明の $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法は、細胞として、(i)スクリーニングツール用ポリペプチドと、(ii)C末端のアミノ酸配列が、配列番号16で表されるアミノ酸配列であり、しかも、ホスホリパーゼC活性促進性G蛋白質のホスホリパーゼC活性促進活性を有する部分ポリペプチドと $\text{Gi}$ の受容体共役活性を有する部分ポリペプチドとのキメラであるG蛋白質キメラ（例えば、 $\text{Gqi}$ ）とを共発現している細胞（以下、 $\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞と称する）を使用する。本発明の $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法においてインバースアゴニストであるか否かを検出する場合には、 $\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞と試験化合物とを接触させ、前記 $\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を、直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）する。 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化は、例えば、カルシウム結合性蛍光試薬（例えば、fura2又はfluo3等）を用いて、直接的に $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を分析することもできるし、あるいは、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子〔例えば、ルシフェラーゼの遺伝子の upstream にアクチベータープロテイン1（AP1）応答配列を挿入した遺伝子〕の転写活性を分析することにより、間接的に $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を分析することもできる。 $\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞と試験化合物とを接触させた場合に、 $\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少すれば、前記試験化合物は、FGKに対するインバースアゴニストであると判定することができる。なお、コントロールとして、スクリーニングツール用ポリペプチドと $\text{Gqi}$ とを共発現している $\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現されておらず、しかも、 $\text{Gqi}$ が発現しているコントロール用細胞、あるいは、形質転換前の宿主細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物により前記コントロール用細胞又は前記宿主細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少しないことを確認することが好ましい。

より具体的には実施例4の方法を利用することにより実施できる。

これまで説明したように、本発明の $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法においては、共役蛋白質として $\text{Gi}$ をそのまま使用するのではなく、 $\text{Gqi}$ を使用するので、cAMP濃度ではなく、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を分析することによりインバースアゴニストであるか否かの検出を実

施することができる。通常、cAMP濃度に比べ、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の方が、より簡易且つ迅速に測定することができる。

### 【0013】

#### 2) cAMP型検出方法

本発明のcAMP型検出方法では、スクリーニングツール用細胞をcAMP型検出用細胞として使用する。通常の宿主細胞ではGiが構成的に発現しているので、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することが知られている天然の細胞又はその細胞株を用いるか、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより、cAMP型検出用細胞を得ることができる。

本発明のcAMP型検出方法においてインバーサゴニストであるか否かを検出する場合には、cAMP型検出用細胞と試験化合物とを接触させ、前記cAMP型検出用細胞内のcAMP濃度の変化を、直接的又は間接的に分析（すなわち、測定又は検出）する。cAMP濃度の変化は、例えば、市販のcAMP測定キット（アマシャム社等）を用いて、直接的にcAMP濃度の変化を分析することもできるし、あるいは、cAMP濃度に依存して転写量が調節される遺伝子〔例えば、ルシフェラーゼの遺伝子の上流にcAMP応答配列（CRE）を挿入した遺伝子〕の転写活性を分析することにより、間接的にcAMP濃度の変化を分析することもできる。

cAMP型検出用細胞と試験化合物とを接触させた場合に、cAMP型検出用細胞内のcAMP濃度が上昇すれば、前記試験化合物は、FGKに対するインバーサゴニストであると判定することができる。また、コントロールとして、スクリーニングツール用ポリペプチドとGiとを発現しているcAMP型検出用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現されていない細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物により前記細胞内のcAMP濃度が上昇しないことを確認することが好ましい。より具体的には、例えば、実施例4と同様の条件において、低用量の（例えば $0.2\mu\text{g}$ ）FGKを発現させた場合において試験化合物を接触させた場合に試験化合物を接触させない場合と比較してcAMP濃度が上昇するか否かを検出することにより実施できる。

### 【0014】

### 3) GTP $\gamma$ S結合型検出方法

本発明のGTP $\gamma$ S結合型検出方法は、スクリーニングツール用ポリペプチド、前記ポリペプチドを含む細胞膜画分、あるいは、前記ポリペプチドを発現している細胞を用いて、GTP $\gamma$ S結合法（Lazareno, S. 及びBirdsall, N. J. M., Br. J. Pharmacol., 109, 1120-1127, 1993）を利用して、FGKに対するインバーサゴニストであるか否かを検出することができる。スクリーニングツール用ポリペプチドを発現することが知られている天然の細胞又はその細胞株を用いるか、スクリーニングツール用ポリペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより、GTP $\gamma$ S結合型検出方法用の細胞又は細胞膜画分（GTP $\gamma$ S型検出用細胞）を得ることができる。

例えば、以下の手順により実施することができる。

すなわち、スクリーニングツール用ポリペプチドを含む細胞膜を、20mmol/L-HEPES(pH 7.4)、100mmol/L-NaCl、10mmol/L-MgCl<sub>2</sub>、及び50mmol/L-GDP混合溶液中で、35 Sで標識されたGTP $\gamma$ S(400pmol/L)と混合する。試験化合物存在下と試験化合物不在下とでインキュベートした後、反応液をガラスフィルター等で濾過し、フィルターに残存するGTP $\gamma$ Sの放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。試験化合物存在下における特異的なGTP $\gamma$ S結合の低下を指標に、FGKに対するインバーサゴニストであるか否かを検出することができる。また、コントロールとして、スクリーニングツール用ポリペプチドを発現している細胞膜の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現していない細胞膜を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物存在下においてGTP $\gamma$ S結合が低下しないことを確認することが好ましい。

### 【0015】

#### <CTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法>

本発明にはFGKの活性阻害を指標にしてCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法が包含される。該方法には、CTGF遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイ系が使用できる。既に上述したように、CTGFが腎線維化においてTGF- $\beta$ の下流に位置するサイトカインであることが明らかになり、CTGFが

腎不全治療薬の創薬標的であることが示されている。本発明者らは後述の実施例3に示すようにFGKが腎不全における創薬標的と考えられるCTGFのプロモーターを活性化することを見出し、更に、FGKの活性阻害を指標にCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法を確立した。

本発明のCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法は、下流にレポーター遺伝子を保持する配列番号13のDNA（CTGFプロモーター）を発現しているスクリーニングツール用細胞と試験化合物とを接触させる工程及び前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴としてCTGFの発現を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

該方法で用いる細胞として、（i）スクリーニングツール用ポリペプチドと、（ii）CTGFプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子とを共発現している細胞（以下、CTGFプロモーター型検出用細胞と称する）を使用することができる。なお、前記細胞は、形質転換する前の宿主細胞が、腎臓由来の細胞であることが好ましい。このような細胞としては、例えば、前出のHEK293細胞を挙げることができる。

レポーター遺伝子アッセイ（田村ら、転写因子研究法、羊土社、1993年）は、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして遺伝子の発現調節を検出する方法である。一般に遺伝子の発現調節はその上流域に存在するプロモーター領域と呼ばれる部分で制御されており、転写段階での遺伝子発現量はこのプロモーターの活性を測定することで推測することができる。試験物質がプロモーターを活性化すれば、プロモーター領域の下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このようにプロモーター活性化作用すなわち発現亢進作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。したがって、CTGFプロモーター領域を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、CTGFの発現調節に対する試験化合物の作用はレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。配列番号16で表される塩基配列からなるCTGFプロモーター領域と融合された「レポーター遺伝子」は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（CAT）、ホタル由

来のルシフェラーゼ遺伝子 (Luc)、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子 (GFP) 等があげられる。レポーター遺伝子は、配列番号 16 で表される塩基配列からなる CTGF のプロモーター領域と機能的に融合されていればよい。CTGF プロモーター型検出用細胞に試験化合物を接触した場合と接触しなかった場合のレポーター遺伝子の発現量を比較することにより試験化合物依存的な転写誘導活性の変化を分析することができる。

コントロールとして CTGF プロモーター型検出用細胞の代わりに、スクリーニングツール用ポリペプチドが発現されておらず、しかも CTGF プロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子が発現しているスクリーニングツール用細胞を用いて同様の操作を行ない、前記試験化合物により前記スクリーニングツール用細胞におけるレポーター活性が抑制されないことを確認することが好ましい。

上記工程を実施し、レポーター活性を抑制する物質を選択することにより、CTGF の発現を抑制する物質のスクリーニングを実施できる。具体的には、実施例 3 に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。たとえば実施例 3 に記載のアッセイ条件に試験化合物を追加することにより、実施例 3 の条件下で IC<sub>50</sub> が 10  $\mu$ M 以下の物質を、好ましくは IC<sub>50</sub> が 1  $\mu$ M 以下の物質を、更に好ましくは IC<sub>50</sub> が 0.1  $\mu$ M 以下の物質を、CTGF 発現を抑制する活性を有する物質として選択することができる。

#### 【0016】

##### <腎不全治療薬をスクリーニングする方法>

本発明の腎不全治療薬スクリーニングツール (ポリペプチド型腎不全治療薬スクリーニングツール及び細胞型腎不全治療薬スクリーニングツールの両方を含む) を用いると、腎不全治療薬をスクリーニングすることができる。

既に説明したように、CTGF が腎線維化において TGF- $\beta$  の下流に位置するサイトカインであることが明らかになり、CTGF が腎不全治療薬の創薬標的であることすなわち CTGF の発現を制御する物質は腎不全治療薬となることが示されている。また、FGK は腎臓に局在することが明らかとなっている。更に、本発明者らは実施例 3 に記載するように FGK が CTGF プロモーターを活性すること及びヒト I 型コラーゲンアルファ 2 サブユニット (COL1A2) プロモーターを活性化することを見出して



いる。これらの知見によれば、FGKに対するインバースアゴニスト又はFGK活性阻害によりCTGFの発現を抑制する物質は腎不全治療薬として有用である。従って、これまで説明したスクリーニングツール用ポリペプチドそれ自体、あるいは、スクリーニングツール用細胞それ自体を、腎不全治療薬のスクリーニングにスクリーニングツールとして用いることができる。

本発明の腎不全治療薬スクリーニングツールを用いてスクリーニングにかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法（Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明の腎不全治療薬スクリーニングツールにより選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いることができる。

本発明のスクリーニング方法は検出方法により以下の3つに大別されるが、いずれかの方法を用いて、あるいはこれらを組み合わせることによって、腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。以下、本発明のスクリーニング方法、

- (1) FGK活性変化を指標とするスクリーニング方法
- (2) FGK活性阻害を指標としてCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法
- (3) COLIA2プロモーターを利用しFGK活性変化を指標とするスクリーニング方法

について、順次説明する。

#### 【0017】

(1) FGK活性変化を指標とするスクリーニング方法には、

- 1) 細胞内における $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変動を指標として、FGKに対するインバースアゴ

ニストをスクリーニングする方法（以下、 $\text{Ca}^{2+}$ 型スクリーニング方法と称する）  
；

2) 細胞内におけるcAMP量の変動を指標として、FGKに対するインバースアゴニストをスクリーニングする方法（以下、cAMP型スクリーニング方法と称する）；  
及び

3)  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合法を利用するFGKに対するインバースアゴニストをスクリーニングする方法（以下、 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合型スクリーニング方法と称する）

が含まれ、以下順次説明する。

#### 1) $\text{Ca}^{2+}$ 型スクリーニング方法

本発明の $\text{Ca}^{2+}$ 型スクリーニング方法は、本発明の $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法により、FGKインバースアゴニストであるか否かを検出する工程、及びFGKインバースアゴニストを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

インバースアゴニストは、前記 $\text{Ca}^{2+}$ 型検出方法において、試験化合物による $\text{Ca}^{2+}$ 型検出用細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の減少を指標に、スクリーニングすることができる。

例えば試験化合物を一定時間作用させ、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の減少を指標に、その $\text{IC}_{50}$ が $10\ \mu\text{M}$ 以下の物質を、好ましくは $\text{IC}_{50}$ が $1\ \mu\text{M}$ 以下の物質を、更に好ましくは $\text{IC}_{50}$ が $0.1\ \mu\text{M}$ 以下の物質を、FGKインバースアゴニストとして選択することができる。本発明の $\text{Ca}^{2+}$ 型スクリーニング方法でインバースアゴニストをスクリーニングすることにより、腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。

#### 2) cAMP型スクリーニング方法

本発明のcAMP型スクリーニング方法は、本発明のcAMP型検出方法により、FGKインバースアゴニストであるか否かを検出する工程、及びFGKインバースアゴニストを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

インバースアゴニストは、前記cAMP型検出方法において、試験化合物によるcAMP型検出用細胞内のcAMP濃度上昇を指標に、スクリーニングすることができる。細胞内cAMP濃度の上昇を指標に、その $\text{ED}_{50}$ が $10\ \mu\text{M}$ 以下（更に好ましくは $1\ \mu\text{M}$ 以下）の試験化合物を、インバースアゴニスト活性を有する物質として選択す

ることができる。

本発明のcAMP型スクリーニング方法でインバースアゴニストをスクリーニングすることにより、腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。

### 3) GTP $\gamma$ S結合型スクリーニング方法

本発明のGTP $\gamma$ S結合型スクリーニング方法は、本発明のGTP $\gamma$ S結合型検出方法により、FGKインバースアゴニストであるか否かを検出する工程、及びFGKインバースアゴニストを選択する工程を含む限り、特に限定されるものではない。

インバースアゴニストは、前記GTP $\gamma$ S結合型検出方法における、試験化合物による特異的なGTP $\gamma$ S結合の低下を指標にスクリーニングすることができる。本発明のGTP $\gamma$ S結合型スクリーニング方法でインバースアゴニストをスクリーニングすることにより、腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。

#### 【0018】

(2) FGK活性阻害を指標としてCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法

CTGFの発現を制御する物質は腎不全治療薬となることが示されている。従って、本発明のCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、すなわち、下流にレポーター遺伝子を保持するCTGFプロモーターを発現しているスクリーニングツール用細胞と試験化合物とを接触させる工程及び前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴とする方法により腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。より具体的には、実施例3に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。たとえば実施例3に記載のアッセイ条件に試験化合物を追加することにより、実施例3の条件下でIC<sub>50</sub>が10  $\mu$ M以下の物質を、好ましくはIC<sub>50</sub>が1  $\mu$ M以下の物質を、更に好ましくはIC<sub>50</sub>が0.1  $\mu$ M以下の物質を、腎不全治療薬として有用な物質として選択することができる。

#### 【0019】

(3) COLIA2プロモーターを利用しFGK活性変化を指標とするスクリーニング方

## 法

腎不全治療薬の標的となるCTGFのプロモーターを活性化するFGKは、それ自身単独でも腎不全治療薬スクリーニングツールとして有用である。本発明者らは後述の実施例3に示すように、FGKが、COLIA2のプロモーターを活性化することを見出し、COLIA2プロモーターを利用しFGK活性変化を指標とするスクリーニング方法を確立した。FGKの活性阻害をインビトロで検出する系の一つとして以下のCOLIA2プロモーターを利用したレポーターアッセイ系が利用できる。

本発明のCOLIA2プロモーターを利用しFGK活性変化を指標とするスクリーニング方法は、下流にレポーター遺伝子を保持するCOLIA2プロモーターを発現しているスクリーニングツール用細胞と試験化合物とを接触させる工程及び前記細胞におけるレポーター活性を測定する工程を含むことを特徴する。当該スクリーニング方法は、前述のCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法においてCTGFプロモーターのかわりにCOLIA2プロモーターを用いることにより実施できる。上記工程を実施し、レポーター活性を抑制する物質を選択することにより、腎不全治療に有用な物質をスクリーニングすることができる。より具体的には、実施例3に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。たとえば実施例3に記載のアッセイ条件に試験化合物を追加することにより、実施例3の条件下でIC50が $10\text{ }\mu\text{M}$ 以下の物質を、好ましくはIC50が $1\text{ }\mu\text{M}$ 以下の物質を、更に好ましくはIC50が $0.1\text{ }\mu\text{M}$ 以下の物質を、腎不全治療薬として有用な物質として選択することができる。

## 【0020】

## 【実施例】

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. 「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982等) に従って実施可能である。

## 【0021】

(実施例1) FGKをコードする遺伝子の単離

本発明のFGKをコードする全長cDNAは、ヒト腎臓cDNA（クロンテック社）をテンプレートとしてPCRにより取得した。配列番号3で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、配列番号4で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いた（それぞれの5'末端にはXbaI siteが付加してある）。PCRはDNAポリメラーゼ（Pyrobest DNA Polymerase；宝酒造社）を用い、5% DMSO存在下で98℃（30秒）／55℃（30秒）／72℃（2分）のサイクルを30回繰り返した。その結果、約1.0 kbpのDNA断片が増幅された。この断片をXbaIで消化した後、pEF-BOS-dhfr プラスミド（Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322）を用いてクローニングした。構築したプラスミドをpEF-BOS-dhfr-FGKと名付けた。得られたクローンの塩基配列をジデオキシターミネーター法によりABI377 DNA Sequencer（アプライドバイオシステムズ社）を用いて解析したところ、配列番号1で表される塩基配列が得られた。同配列は993塩基のオープンリーディングフレーム（ORF）を持っている。ORFから予測されるアミノ酸配列（330アミノ酸）を配列番号2に示す。

#### 【0022】

（実施例2） ヒト結合組織成長因子（CTGF）プロモーターを用いたレポータープラスミド及びヒトI型コラーゲンアルファ2サブユニット（COLIA2）プロモーターを用いたレポータープラスミドの取得

ヒトCTGF及びヒトCOLIA2遺伝子のプロモーター領域の増幅には、ヒト全血由来のゲノムDNA（Human Genomic DNA；クロンテック社）を鋳型DNAに用いた。CTGFプロモーター領域の増幅にはフォワードプライマーとして、配列番号5で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして、配列番号6で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。またCOLIA2プロモーター領域の増幅にはフォワードプライマーとして、配列番号7で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバースプライマーとして、配列番号8で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。PCRはDNAポリメラーゼ（Pfu turbo DNA Polymerase；ストラタジーン社）を用い、94℃（2分）の後、94℃（30秒）／58℃（30秒）／72℃（2分）のサイクルを35回繰り返した。その結果、CTGFプロモーターの場合は約1.2kbp、COLIA2プロモ

ーターの場合は約0.4kbpのDNA断片が増幅された。その後各増幅産物を1%アガロースゲルにて分離し、スピンカラム (QIAquick Gel Extraction Kit;キアゲン社) にて精製後、これらを鋳型として再度PCRを行った。CTGFプロモーター領域の増幅にはフォワードプライマーとして、配列番号9で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバープライマーとして、配列番号10で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。またCOLIA2プロモーター領域の増幅にはフォワードプライマーとして、配列番号11で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用し、リバープライマーとして、配列番号12で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。なおそれぞれのフォワードプライマーの5'末端にはKpnI認識配列、またリバープライマーの5'末端にはBglIII認識配列が付加してある。PCRはDNAポリメラーゼ (Pfu turbo DNA Polymerase; ストラタジーン社) を用い、94° C (2分) の後、94° C (30秒) / 58° C (30秒) / 72° C (2分) のサイクルを30回繰り返した。その後各増幅産物を1%アガロースゲルにて分離し、スピンカラム (QIAquick Gel Extraction Kit;キアゲン社) にて精製後、KpnI及びBglIIIにて消化し、レポーター発現用プラスミド (ピッカジーンベシクベクター2;東洋インキ社) に挿入してクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法によりABI3700 DNA Sequencer (アプライドバイオシステムズ社) で解析し、既知CTGFプロモーター配列 (GenBank accession No. AL354866) 又はCOLIA2プロモーター配列 (GenBank accession No. AF004877) と合致したクローンをそれぞれ選択した。以上により得られたレポータープラスミドはそれぞれヒトCTGFプロモーターの-1129bpから+24bp (配列番号13)、又はヒトCOLIA2プロモーターの-337bpから+22bp (配列番号14) をルシフェラーゼ遺伝子上流に含んでおり、それぞれpCTGF-luc, pCOLIA2-lucと命名した。

### 【0023】

(実施例3) CTGFプロモーター及びCOLIA2プロモーターレポーターアッセイ系の構築とFGK導入による効果

24ウェルプレート (24-well plate; アサヒテクノグラス社) にHEK293細胞 (ATCCより入手) を10%牛胎児血清入りダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) にて

1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$  細胞で播種して  $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養後、1 ウェルあたり  $0.1 \mu\text{g}$  のレポータープラスミド及び最高で  $0.5 \mu\text{g}$  のヒト FGK 発現プラスミドの計  $0.6 \mu\text{g}$  をトランスフェクション試薬 (FuGENE6; ペーリンガーロシェ社) を用いて添付の指示書に従い遺伝子導入を行った。なお全てのウェル当たりの導入遺伝子量は 1 ウェルあたり計  $0.6 \mu\text{g}$  となる様にプラスミドベクター (pcDNA3.1; インビトロジェン社) を加えて調整した。FGK を含まず pcDNA3.1 ベクターのみをレポータープラスミドと共に形質転換した細胞をコントロールとした。遺伝子導入 24 時間後に培地を廃棄し、細胞溶解液を 1 ウェルあたり  $100 \mu\text{l}$  加えて溶解した。溶解液  $50 \mu\text{l}$  にルシフェリン基質液  $100 \mu\text{l}$  を加えて反応させた後、ルミノメーター (ML3000; ダイナテックラボラトリーズ社) にて測定した。コントロールのルシフェラーゼ活性に対する相対活性 (コントロールを 1 とする) を図 1 に示す。FGK の発現により CTGF プロモーター及び COL1A2 プロモーターの活性化が観察された。またその活性化における FGK の容量依存性も観察された。以上の事から、FGK は CTGF 及び I 型コラーゲンの発現を誘導することが明らかになった。

本アッセイ系を利用することにより、CTGF 発現を抑制する物質及び腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることができる。

#### 【0024】

(実施例 4) FGK 活性変化を指標とするスクリーニング系の構築

本実施例で使用した Gq と Gi とのキメラ蛋白質を発現するための発現プラスミドは、Conklin, B. R. らの方法 (Nature, 363, 274-276, 1993) に従い、Gq の C 末端側の 5 アミノ酸 (Glu-Tyr-Asn-Leu-Val; 配列番号 15 で表されるアミノ酸配列) を、Gi の C 末端側の 5 アミノ酸 (Asp-Cys-Gly-Leu-Phe; 配列番号 16 で表されるアミノ酸配列) と置換して構築した遺伝子 (以下、Gqi 遺伝子と称する) を、プラスミド pEF-BOS-dhfr にクローニングして作製した。構築したプラスミドは、プラスミド pEF-BOS-Gqi と命名した。

具体的な方法としては、まず 24 ウェルプレート (24-well plate; アサヒテクノグラス社) に HEK293 細胞 (ATCC より入手) を 10% 牛胎児血清入りダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) にて 1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$  細胞で播種して 24 時間培養後、1 ウェルあたり  $0.05 \mu\text{g}$  のルシフェラーゼの遺伝子の上流に血清応答配列を

挿入したレポータープラスミドpSRE-luc (PathDetect™ SRE cis-Reporting System; ストラタジーン社)、0.05  $\mu$ gのpEF-BOS-Gqi及び最高で0.5  $\mu$ gのヒトFGK発現プラスミド計0.6  $\mu$ gをトランスフェクション試薬 (FuGENE6; ベーリンガーロシェ社) を用いて遺伝子導入を行った。FGKを含まずpcDNA3.1ベクターのみをレポータープラスミド及びpEF-BOS-Gqiと共に形質転換した細胞をコントロールとした。他の条件及びレポーター活性の測定は実地例3に従った。コントロールのルシフェラーゼ活性に対する相対活性 (コントロールを1とする) を図2に示す。FGKの発現によりレポーター活性の上昇が観察された。またその活性化におけるFGKの容量依存も観察された。以上の事から、本アッセイ系によってFGK活性を阻害する物質、すなわち腎不全治療薬として有用な物質をスクリーニングすることが可能となった。

#### 【0025】

##### 【発明の効果】

FGKがCTGFのプロモーターを活性化することを見出した。CTGFは腎不全における創薬標的であることが知られており、従って、FGKおよび/または本受容体で形質転換した細胞を用いることによって、FGK阻害を指標にCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、すなわちFGK阻害剤を選択することによるCTGF発現抑制に基づく腎不全治療薬のスクリーニング方法及びFGK阻害剤を選択することによる腎不全治療薬をスクリーニングする方法を構築することができる。

#### 【0026】

##### 【配列表フリーテキスト】

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号 3、4、9～12の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

#### 【0027】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING



<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd.

<120> Methods for screening an agent to treat renal failure

<130> 3199SCA

<160> 16

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 993

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(990)

<223> inventor:Enjo, Kentaro; Kuromitsu, Sadao

<400> 1

atg gca tgg aat gca act tgc aaa aac tgg ctg gca gca gag gct gcc 48

Met Ala Trp Asn Ala Thr Cys Lys Asn Trp Leu Ala Ala Glu Ala Ala

1 5 10 15

ctg gaa aag tac tac ctt tcc att ttt tat ggg att gag ttc gtt gtg 96

Leu Glu Lys Tyr Tyr Leu Ser Ile Phe Tyr Gly Ile Glu Phe Val Val

20 25 30

gga gtc ctt gga aat acc att gtt gtt tac ggc tac atc ttc tct ctg 144  
Gly Val Leu Gly Asn Thr Ile Val Val Tyr Gly Tyr Ile Phe Ser Leu  
35 40 45

aag aac tgg aac agc agt aat att tat ctc ttt aac ctc tct gtc tct 192  
Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asn Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ser Val Ser  
50 55 60

gac tta gct ttt ctg tgc acc ctc ccc atg ctg ata agg agt tat gcc 240  
Asp Leu Ala Phe Leu Cys Thr Leu Pro Met Leu Ile Arg Ser Tyr Ala  
65 70 75 80

aat gga aac tgg ata tat gga gac gtg ctc tgc ata agc aac cga tat 288  
Asn Gly Asn Trp Ile Tyr Gly Asp Val Leu Cys Ile Ser Asn Arg Tyr  
85 90 95

gtg ctt cat gcc aac ctc tat acc agc att ctc ttt ctc act ttt atc 336  
Val Leu His Ala Asn Leu Tyr Thr Ser Ile Leu Phe Leu Thr Phe Ile  
100 105 110

agc ata gat cga tac ttg ata att aag tat cct ttc cga gaa cac ctt 384  
Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Lys Tyr Pro Phe Arg Glu His Leu  
115 120 125

ctg caa aag aaa gag ttt gct att tta atc tcc ttg gcc att tgg gtt 432  
Leu Gln Lys Lys Glu Phe Ala Ile Leu Ile Ser Leu Ala Ile Trp Val  
130 135 140

tta gta acc tta gag tta cta ccc ata ctt ccc ctt ata aat cct gtt 480  
Leu Val Thr Leu Glu Leu Leu Pro Ile Leu Pro Leu Ile Asn Pro Val  
145 150 155 160

ata act gac aat ggc acc acc tgt aat gat ttt gca agt tct gga gac 528  
Ile Thr Asp Asn Gly Thr Thr Cys Asn Asp Phe Ala Ser Ser Gly Asp  
165 170 175

ccc aac tac aac ctc att tac agc atg tgt cta aca ctg ttg ggg ttc 576  
Pro Asn Tyr Asn Leu Ile Tyr Ser Met Cys Leu Thr Leu Leu Gly Phe  
180 185 190

ctt att cct ctt ttt gtg atg tgt ttc ttt tat tac aag att gct ctc 624  
Leu Ile Pro Leu Phe Val Met Cys Phe Phe Tyr Tyr Lys Ile Ala Leu  
195 200 205

ttc cta aag cag agg aat agg cag gtt gct act gct ctg ccc ctt gaa 672  
Phe Leu Lys Gln Arg Asn Arg Gln Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Glu  
210 215 220

aag cct ctc aac ttg gtc atc atg gca gtg gta atc ttc tct gtg ctt 720  
Lys Pro Leu Asn Leu Val Ile Met Ala Val Val Ile Phe Ser Val Leu  
225 230 235 240

ttt aca ccc tat cac gtc atg cgg aat gtg agg atc gct tca cgc ctg 768  
Phe Thr Pro Tyr His Val Met Arg Asn Val Arg Ile Ala Ser Arg Leu  
245 250 255

ggg agt tgg aag cag tat cag tgc act cag gtc gtc atc aac tcc ttt 816

Gly Ser Trp Lys Gln Tyr Gln Cys Thr Gln Val Val Ile Asn Ser Phe  
260 265 270

tac att gtg aca cgg gct ttg ggc ttt ctg aac agt gtc atc aac cct 864  
Tyr Ile Val Thr Arg Ala Leu Gly Phe Leu Asn Ser Val Ile Asn Pro  
275 280 285

gtc ttc tat ttt ctt ttg gga gat cac ttc agg gac atg ctg atg aat 912  
Val Phe Tyr Phe Leu Leu Gly Asp His Phe Arg Asp Met Leu Met Asn  
290 295 300

caa ctg aga cac aac ttc aaa tcc ctt aca tcc ttt agc aga tgg gct 960  
Gln Leu Arg His Asn Phe Lys Ser Leu Thr Ser Phe Ser Arg Trp Ala  
305 310 315 320

cat gaa ctc cta ctt tca ttc aga gaa aag tga 993  
His Glu Leu Leu Leu Ser Phe Arg Glu Lys  
325 330

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Trp Asn Ala Thr Cys Lys Asn Trp Leu Ala Ala Glu Ala Ala  
1 5 10 15

Leu Glu Lys Tyr Tyr Leu Ser Ile Phe Tyr Gly Ile Glu Phe Val Val  
20 25 30

Gly Val Leu Gly Asn Thr Ile Val Val Tyr Gly Tyr Ile Phe Ser Leu  
35 40 45

Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asn Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ser Val Ser  
50 55 60

Asp Leu Ala Phe Leu Cys Thr Leu Pro Met Leu Ile Arg Ser Tyr Ala  
65 70 75 80

Asn Gly Asn Trp Ile Tyr Gly Asp Val Leu Cys Ile Ser Asn Arg Tyr  
85 90 95

Val Leu His Ala Asn Leu Tyr Thr Ser Ile Leu Phe Leu Thr Phe Ile  
100 105 110

Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Lys Tyr Pro Phe Arg Glu His Leu  
115 120 125

Leu Gln Lys Lys Glu Phe Ala Ile Leu Ile Ser Leu Ala Ile Trp Val  
130 135 140

Leu Val Thr Leu Glu Leu Leu Pro Ile Leu Pro Leu Ile Asn Pro Val  
145 150 155 160

Ile Thr Asp Asn Gly Thr Thr Cys Asn Asp Phe Ala Ser Ser Gly Asp  
165 170 175

Pro Asn Tyr Asn Leu Ile Tyr Ser Met Cys Leu Thr Leu Leu Gly Phe  
180 185 190

Leu Ile Pro Leu Phe Val Met Cys Phe Phe Tyr Tyr Lys Ile Ala Leu  
195 200 205

Phe Leu Lys Gln Arg Asn Arg Gln Val Ala Thr Ala Leu Pro Leu Glu  
210 215 220

Lys Pro Leu Asn Leu Val Ile Met Ala Val Val Ile Phe Ser Val Leu  
225 230 235 240

Phe Thr Pro Tyr His Val Met Arg Asn Val Arg Ile Ala Ser Arg Leu  
245 250 255

Gly Ser Trp Lys Gln Tyr Gln Cys Thr Gln Val Val Ile Asn Ser Phe  
260 265 270

Tyr Ile Val Thr Arg Ala Leu Gly Phe Leu Asn Ser Val Ile Asn Pro  
275 280 285

Val Phe Tyr Phe Leu Leu Gly Asp His Phe Arg Asp Met Leu Met Asn  
290 295 300

Gln Leu Arg His Asn Phe Lys Ser Leu Thr Ser Phe Ser Arg Trp Ala  
305 310 315 320

His Glu Leu Leu Leu Ser Phe Arg Glu Lys  
325 330

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 3

ggtctagaat ggcatggaat gcaacttgc

29

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 4

ggtctagatt atcacttttc tctgaatgaa ag

32

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tcaggctgca tggttccttg

19



<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tcctctcagc ggggaagag

19

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gacgtgtccc atagtgtttc c

21

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

tcctgctgcc gtggtgct

18

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 9

ggggtacctc aggctgcatg ttccttg

27

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 10

ggaagatctt cctctcagcg gggaagag

28

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 11

ggggtaccga cgtgtcccat agtgtttcc

29

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized  
primer sequence

<400> 12

ggaagatcctt cctgctgccg tgggtgct

27

<210> 13

<211> 1159

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

tcaggctgca tgttccttgg gtaatgagaa gtcacaatca ctattcatag atgtgtgggg

60

agtcactaaa aatatattat tcactgtcaa tcttagttta tatccagata caacagggta 120

cactgtcttt gtaatggaat cagacttctt attttaacaa gacaaaccaa atccaatcca 180

cattgaaga ttataggttt taatataaga aaatgcactc atttctcaaa gaccctagt 240

aagctgtgtt taaatgctcc taggtgaacc ccctttgcat ccagtggtc ccaccctgac 300

accagagcc cctacctacc caacacagaa tcatttgctc tgatagaaca atggatccct 360

tttctggaa acattgatgg ccactcctcc cttgtccttg cctatataaa actcctacat 420

atattaagag aaaactaagc aagagttttg gaaatctgcc ccaggagact gcatcctgag 480

tcacacgct cttgtttctc tttcttgtcc caaaaccgtt acctcaagtg acaaattgatc 540

aatctcaaa tatagaattc agggttttac aggtaggcat cttgaggatt tcaaattggtt 600

aaaagcaact cactcctttt ctactctttg gagagtcca agagcctata gcctctaaaa 660

cgcaaatcat tgctaagggt tgggggggag aaacctttc gaattttta ggaattcctg 720

ctgtttgcct cttcagctac ctacttccta aaaaggatgt atgtcagtgg acagaacagg 780

gcaaacttat tcgaaaaaga aataagaaat aattgccagt gtgtttataa atgatatgaa 840

tcaggagtgg tgcgaagagg atagggaaaa aaaaattcta tttggtgctg gaaatactgc 900

gctttttttt ttcctttttt tttttttctg tgagctggag tgtgccagct ttttcagacg 960

gaggaatgct gagtgtcaag gggtcaggat caatccggtg tgagttgatg aggcaggaag 1020

gtggggagga atgcgaggaa tgtccctgtt tgtgtaggac tccattcagc tcattggcga 1080

gccgcggccg cccggagcgt ataaaagcct cgggccgccc gcccctaaact cacacaacaa 1140

ctcttccccg ctgagagga 1159

<210> 14

<211> 355

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

gacgtgtccc atagtgtttc caaacttggg aagggcgggg gagggcggga ggatgcggag 60

ggcggaggta tgcagacaac gagtcagagt ttccccttga aagcctcaaa agtgtccacg 120

tcctcaaaaa gaatggaacc aatttaagaa gccagccccg tggccacgtc ctttccccca 180

ttcgctccct cctctgcgcc cccgcaggct cctcccagct gtggctgccc gggccccag 240

ccccagccct ccattgggtg gaggcccttt tggaggcacc ctagggccag ggaaactttt 300

gccgtataaa tagggcagat ccgggcttta ttattttagc accacggcag cagga 355

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Tyr Asn Leu Val

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asp Cys Gly Leu Phe

1 5

【 0 0 2 8 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

HEK293細胞にpCTGF-luc, 又はpCOLIA2-lucレポータープラスミドを導入したときのルシフェラーゼ活性及びその活性のFGK遺伝子導入による変化を示すグラフである。

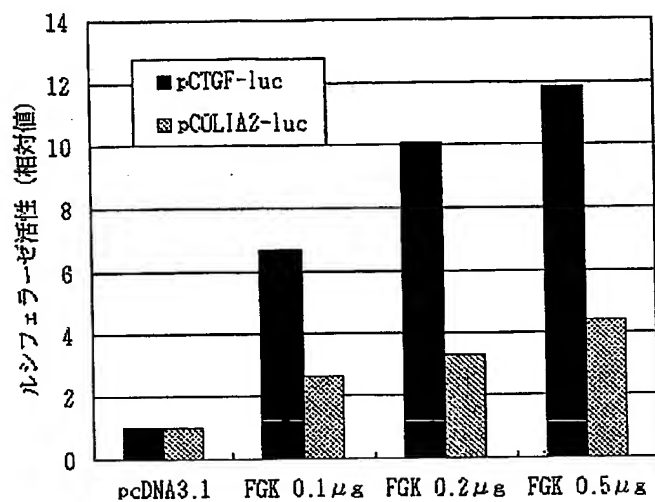
【図 2】

HEK293細胞にpEF-BOS-Gqi及びpSRE-lucレポータープラスミドを同時に導入し

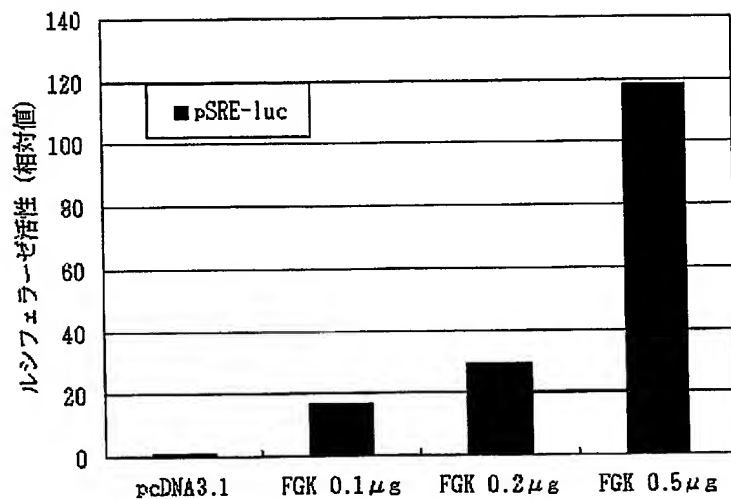
たときのルシフェラーゼ活性及びその活性のFGK遺伝子導入による変化を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、腎不全治療薬をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 FGKがCTGFのプロモーターを活性化することを見出し、これによりFGK阻害を指標にCTGF発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、すなわちFGK阻害剤を選択することによるCTGF発現抑制に基づく腎不全治療薬のスクリーニング方法及びFGK阻害剤を選択することによる腎不全治療薬をスクリーニングする方法を確立し本発明を完成させた。

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-298958
受付番号	50201538515
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年10月15日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】

平成14年10月11日

次頁無

特願 2002-298958

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所

氏名

1990年 8月10日

新規登録

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

山之内製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**